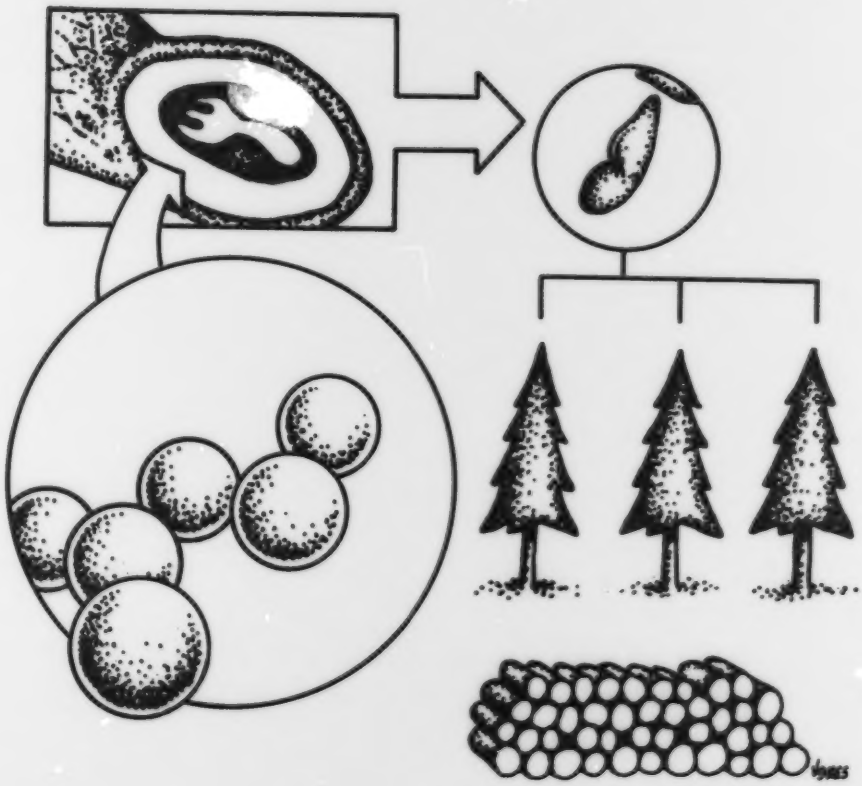
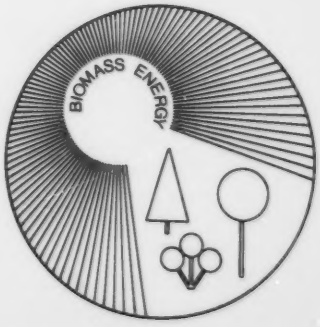
Forêts Canada
Forestry Canada

Biotechnologie et sylviculture énergétique : Résumés du symposium de l'AEI

W.M. Cheliak et A.C. Yapa, éditeurs

Rapport d'information PI-X-84F
Institut forestier national de Petawawa





Canada

INSTITUT FORESTIER NATIONAL DE PETAWAWA

Le mandat de l'Institut forestier national de Petawawa, comme celui des autres établissements de Forêts Canada, est de promouvoir une meilleure gestion et une utilisation plus rationnelle des ressources forestières du Canada, pour le bien économique et social de tous les Canadiens. Les objectifs des activités des programmes menés à l'Institut appuient ce mandat à travers la découverte, le développement, la démonstration, l'application et le transfert des innovations. En tant qu'institut national, il doit s'attacher à des problèmes qui débordent le cadre régional ou qui nécessitent des compétences particulières de même qu'un équipement non disponible aux installations régionales de Forêts Canada. La plupart du temps, les recherches sont effectuées en étroite collaboration avec le personnel des centres régionaux, des services forestiers des provinces et de l'industrie forestière.

Les travaux de recherche et les services techniques de l'Institut sont regroupés autour de cinq principales activités:

GÉNÉTIQUE FORESTIÈRE ET BIOTECHNOLOGIE — Ce programme encadre des études sur la génétique forestière, la microbiologie, la micropropagation, la génétique moléculaire et la recherche sur les semences. Il comprend également les services à la clientèle et la banque de semences du Centre national de semences forestières. Lié à plusieurs organismes internationaux, ce centre existe depuis longtemps.

SYSTÈMES D'AMÉNAGEMENT FORESTIER — Ce programme intègre en recherche et développement des opérations concernant les incendies de forêt, la télédétection, la météorologie, la modélisation, la croissance, la récolte et le RIMA. Il permet ainsi l'élaboration et la démonstration de systèmes d'aménagement forestier.

STATISTIQUES NATIONALES SUR LES RESSOURCES FORESTIÈRES — Ce programme fournit les renseignements biologiques, techniques et socio-économiques sur les ressources forestières du Canada. Il vise le développement des bases de données et l'établissement de nouveaux logiciels et bases de données pour aider à l'élaboration des politiques forestières. Le Programme d'inventaire forestier recueille l'information sur les forêts au niveau national, maintient le Système sur les ressources forestières canadiennes et prépare l'inventaire des forêts du Canada.

COMMUNICATIONS — Ce programme regroupe les services offerts par la bibliothèque, les travaux touchant la sensibilisation du public, les renseignements, la rédaction-révision et les publications. L'Institut reçoit plus de 20 000 visiteurs chaque année. Le Centre d'accueil, des visites autoguidées et un programme éducatif complet sont ouverts à tous. C'est à l'IFNP que l'on trouve l'entrepôt et le centre de distribution national de toutes les publications scientifiques de Forêts Canada.

LA FORÊT EXPÉRIMENTALE — Outre des peuplements naturels où l'on applique divers traitements dans le cadre des plans de recherche en sylviculture, la Forêt de Petawawa, mesurant 100 km^2, comprend de vastes superficies de plantations âgées de plus de 60 ans. Les plantations expérimentales livrent des données sur la croissance et la récolte à la suite des expériences de culture. Elles fournissent aussi du matériel génétique dont le lignage est répertorié et qui se révèlent de plus en plus utiles pour les études sur la micropropagation et la génétique moléculaire. C'est un lieu par excellence pour mettre à l'essai des stratégies d'aménagement forestier à court et à long termes.

BIOTECHNOLOGIE ET SYLVICULTURE ÉNERGÉTIQUE : RÉSUMÉS DU SYMPOSIUM DE L'AEI

W.M. Cheliak et A.C. Yapa, éditeurs

Rapport d'information PI-X-84F
Institut forestier national de Petawawa
Forêts Canada
1989

90-00225/

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada, 1989
N° de catalogue Fo46-11/84-1988F
ISBN 0-662-95343-6
ISSN 0228-0736
Imprimé au Canada

Il est possible d'obtenir sans frais des exemplaires de cette publication auprès de :

Forêts Canada
Centre d'information technique et de distribution
Institut forestier national de Petawawa
Chalk River (Ontario)
K0J 1J0

N° de téléphone : 613-589-2880

Des copies ou des microfiches de cette publication sont en vente à l'adresse suivante :

Micromédia Ltée
Place du Portage
165, rue Hôtel-de-Ville
Hull (Québec)
J8X 3X2

This publication is also available in English under the title **Biotechnology in Energy Forestry: IEA Symposium Abstracts.**

Table des matières

v Préface

vi Ordre du jour du symposium

1 Plasma germinatif et programmes de recherche en génétique classique – V. Koski et A. Viherä-Arnio

6 Caractérisation biochimique et ultrastructurale des cals embryogéniques et non embryogéniques chez l'épinette de Norvège – S.R. Wann

9 La biochimie du développement végétal et ses applications biotechnologiques chez les conifères – E.G. Kirby

12 Transfert de l'ADN chez les pins – R. Sederoff, A.-M. Stomp, W.S. Chilton et L.W. Moore

14 La transformation des cellules végétales – M.P. Gordon

16 L'expression génique chez les végétaux – T.J. Parsons

18 La production de végétaux du genre *Populus* tolérants au glyphosate grâce à l'expression d'un gène *aroA* mutant de *Salmonella typhimurium* – J.J. Fillatti, J. Sellmer, B. McCown, B. Haissig, L. Comai et D. Remenschnieder

Le symposium a été tenu sous les auspices de l'Agence internationale de cadre de la 2e Tâche de l'Accord sur la Bioénergie.

PRÉFACE

La biotechnologie a suscité un vif intérêt dans plusieurs domaines de la biologie. En foresterie, cette technologie peut trouver de multiples champs d'application tant au niveau de l'aménagement des ressources (production, croissance et protection des arbres) qu'à celui de leur utilisation (bioconversion et gestion des déchets).

Comme l'aménagement des cultures est habituellement plus intensif en sylviculture énergétique qu'en foresterie conventionnelle, la sylviculture énergétique offre des conditions favorables à la réalisation de développements biotechnologiques. C'est dans cet esprit que le symposium d'Uppsala a été organisé.

Cette rencontre avait pour but d'essayer de faire de la biotechnologie un outil pour l'aménagement des plantations. Ainsi, les ressources en plasmas germinatifs, le développement des ressources génétiques, l'aménagement des cultures, la culture de tissus, la génétique moléculaire et le génie génétique ont retenu notre attention. Nous avons également eu l'occasion de discuter longuement de certains détails et de la possibilité d'intégrer les techniques présentées dans un programme d'aménagement des cultures.

Biotechnologie et sylviculture énergétique : Résumé du symposium

ORDRE DU JOUR DU SYMPOSIUM

Le mardi 4 novembre 1986

LE PEUPLEMENT: AMÉNAGEMENT GÉNÉTIQUE, CLASSIQUE ET ARBRES D'AVENIR

8 h 30 à 9 h 00
Accueil et présentation générale de l'ESO et de l'AEI
Louis Zsuffa, Université de Toronto, CANADA

9 h 00 à 10 h 00
Plasma germinatif et programmes de recherche en génétique classique
Veikko Koski et Anneli Viherä-Aarnio
Institut finlandais de recherche forestière, FINLANDE

10 h 00 à 11 h 00
Pause et séances d'affichage

11 h 00 à 12 h 00
Aménagement et sylviculture des forêts énergétiques
Kurth Perttu, Université agronomique de Suède, SUÈDE

12 h 00 à 14 h 00
Déjeuner

14 h 00 à 15 h 00
Étude de l'action génique à l'aide de la génétique moléculaire
Francis Yeh, Université d'Alberta, CANADA

15 h 00 à 15 h 30
Pause et séances d'affichage

15 h 30 à 16 h 30
L'amélioration génétique des rendements forestiers - L'arbre d'avenir
Warren Nance, USDA Forest Service, USA

Le mercredi 5 novembre 1986

LA CELLULE ET LA CULTURE DE TISSUS CHEZ LES PLANTES VIVACES LIGNEUSES

9 h 00 à 10 h 00
La culture de tissus: Techniques et considérations générales
Tage Ericksson, Institut de physiologie végétale, SUÈDE

10 h 00 à 11 h 00
Pause et séances d'affichage

11 h 00 à 12 h 00
Micropropagation et organogénèse
Chris Bornman, Hilleshog Research AB, SUÈDE

12 h 00 à 14 h 00
Déjeuner

14 h 00 à 15 h 00
L'embryogénèse somatique
Steve Wann, Institute of Paper Chemistry, USA

15 h 00 à 15 h 30
Pause et séances d'affichage

15 h 30 à 16 h 30
La cellule et la technologie des protoplastes
Brent McCown, Université du Wisconsin, USA

Le jeudi 6 novembre 1986

GÉNÉTIQUE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

8 h 30 à 9 h 30
Le dépistage de maladies *in vitro*
Frederick Valentine, State University of New York, USA

9 h 30 à 10 h 30
La biochimie du développement végétal
Ned Kirby, Rutgers University, USA

10 h 30 à 11 h 00
Pause et séances d'affichage

11 h 00 à 12 h 00
Le transfert de l'ADN chez les pins
Ron Sederoff, USDA Forest Service, USA

12 h 00-
Déjeuner et visites

18 h 00-
Banquet

Le vendredi 7 novembre 1986

GÉNIE GÉNÉTIQUE

8 h 30 à 9 h 30
Vue d'ensemble des méthodes de transfert des gènes
Milt Gordon, University of Washington, USA

9 h 30 à 10 h 30
L'expression génique chez les végétaux
Tom Parsons, University of Washington, USA

10 h 30 à 11 h 00
Pause et séances d'affichage

11 h 00 à 12 h 00
La production des peupliers tolérants au glyphosate
Joanne Fillatti, Calgene Inc., USA

12 h 00 à 14 h 00
Déjeuner

14 h 00-
Synthèse, discussions et planification à long terme

PLASMA GERMINATIF ET PROGRAMMES DE RECHERCHE EN GÉNÉTIQUE CLASSIQUE

V. Koski et A. Viherä-Aarnio

Institut finlandais de recherche forestière
Département de génétique forestière
Boîte postale 18, 01301 Vantaa, Finlande

L'idée d'utiliser des plantes ligneuses à croissance rapide pour produire de l'énergie et de la biomasse est maintenant répandue dans plusieurs pays (Zsuffa et Barkley, 1985). Certaines plantations ont déjà été exploitées sur une base expérimentale. Cependant, bien qu'on ait pu obtenir des rendements élevés qui montraient des augmentations annuelles importantes dans de petites parcelles-échantillon, les plantations extensives, comme celles du programme coopératif d'amélioration des arbres de Caroline du Nord, sont encore trop rares.

Le plasma germinatif utilisé dans les expériences sylvicoles à courte révolution provient de populations naturelles ou de types sauvages des essences en question plutôt que de plants produits intentionnellement par des méthodes d'amélioration génétique. C'est sans doute l'une des raisons pour lesquelles les résultats des expériences passées n'ont pas toujours été encourageants, surtout quand on tient compte des aspects économiques de ces expériences. Le succès et la rentabilité de la sylviculture à courte révolution reposent sur l'amélioration génétique des espèces végétales et sur l'aménagement intensif des forêts.

En matière d'amélioration génétique, nous devons nous montrer ambitieux. On ne peut se contenter de sélectionner des génotypes supérieurs ou des clones dans des populations naturelles ou parmi des hybrides spontanés. Il est plus fructueux de concevoir un modèle idéal de plante et de fabriquer le génotype correspondant, à l'aide des techniques d'amélioration génétique des plantes. Plusieurs auteurs (Dickman 1975, 1985, Siren et al. 1979, Fege 1981, Siren 1985) ont dressé une liste des caractéristiques d'un tel idéotype. En voici quelques-unes:

1. taux élevé de photosynthèse nette;
2. interception efficace de la lumière;
3. utilisation optimale de la saison de croissance;
4. indice de récolte élevé;
5. utilisation efficace de l'eau et des nutriments;
6. croissance juvénile rapide;
7. tolérance à la compétition;
8. tolérance au stress abiotique;
9. résistence aux maladies et aux ennemis des cultures;
10. bois de bonne qualité;
11. facilité de reproduction et d'implantation;
12. aptitude à former des taillis.

Bien entendu, aucun idéotype ne peut convenir à tous les milieux et à tous les usages. Chaque situation requiert une solution particulière. La production d'un cultivar synthétique, c'est-à-dire la réalisation d'un idéotype, ne peut se faire en une seule étape. L'alternance de la sélection et de la recombinaison est la règle en matière d'amélioration génétique des plantes. Dans le cas de l'amélioration génétique des arbres suivant les méthodes classiques, cela signifie habituellement une alternance de croisements et de tests de descendance. Mais en ce qui concerne les espèces à courte révolution, des méthodes plus radicales peuvent également être utilisées comme:

- la polyploïdie naturelle ou provoquée;
- l'hybridation entre provenances et espèces;
- les mutations provoquées et le génie génétique.

Du point de vue paléobotanique, les conifères sont des espèces très anciennes dont la macroévolution s'est arrêtée il y a des millions d'années. Leurs nombres chromosomiques, par exemple, sont très uniformes. Les plantes ligneuses à feuilles caduques sont beaucoup plus jeunes sur le plan phylogénétique et présentent une grande diversité de phénotypes. Ainsi, les espèces à feuilles caduques sont beaucoup plus malléables.

Dans les genres *Betula* et *Salix*, par exemple, on observe plusieurs niveaux de polyploïdie entre les espèces et aussi entre individus d'une même espèce. Ces genres confondent les systématiciens, car on y retrouve souvent des hybrides interspécifiques, et toutes les espèces montrent des variations morphologiques considérables. La formation naturelle d'une nouvelle espèce du genre *Betula* a été observée en Laponie finnoise (Vaarama et Valanne 1973). Le genre *Salix* et d'autres genres pourraient montrer la même potentialité.

Cet article se limite aux espèces et aux genres rencontrés dans les climats nordiques tempérés. Les essais de sylviculture à courte révolution ont porté sur les essences à feuilles caduques. La plupart d'entre elles sont des plantes pionnières et la plupart du temps indésirables dans les plantations classiques. Voici certaines des espèces et des genres les plus utilisés en sylviculture à courte révolution de même que certaines de leurs caractéristiques génétiques.

Les genres les plus prometteurs selon les données recueillies jusqu'à maintenant sont: *Alnus, Platanus, Populus* et *Salix*. Ce sont les genres *Populus* et *Salix* qui ont été utilisés le plus largement et sur la plus longue période. Cependant, plusieurs autres genres, comme *Acer* et *Betula* spp. (Fege 1981, Lavoie et Vallee 1981), offrent un potentiel intéressant pour la sylviculture à courte révolution.

Le genre *Alnus* (aulne) comprend environ 30 espèces, parmi lesquelles *A. cordata, A. glutinosa, A. incana* et *A. rubra* dominent sur le plan de l'importance économique (Krüssmann 1976). La figure 1 montre la répartition géographique naturelle du genre *Alnus*. Les aulnes, étant des espèces pionnières, ont une croissance juvénile rapide et prennent peu de temps pour venir à maturité. Le fait qu'ils peuvent fixer l'azote atmosphérique, grâce aux actinomycètes symbiotiques du genre *Frankia*, leur confère une valeur additionnelle.

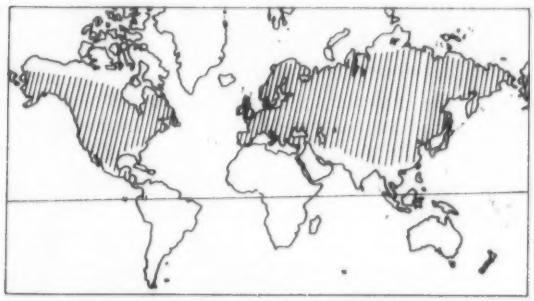


Figure 1. Répartition géographique du genre *Alnus* (d'après Krüssmann 1976)

On a observé une variation génétique importante entre les populations d'aulnes et à l'intérieur de ces populations (Debell et Wilson 1978). Des hybrides interspécifiques d'espèces sympatriques, par exemple *A. glutinosa* x *A. incana*, existent en faibles proportions. Certains hybrides artificiels comme *A. glutinosa* x *A. rubra* donnent des résultats intéressants (Ljunger 1959, 1972). L'aulne se régénère de façon végétative dans la nature et, par conséquent, l'aménagement de taillis peut être réalisé avec succès.

Le genre *Populus* comprend environ 35 espèces majeures réparties en cinq groupes (Rehder 1947, Krüssmann 1976). Le nombre chromosomique habituel de ce genre est 2n=38, mais des cas exceptionnels de polyploïdie ont été observés chez plusieurs espèces. Les peupliers sont généralement dioïques, mais il arrive fréquemment que l'on rencontre des individus hermaphrodites. La régénération végétative est très intense chez les peupliers. L'hybridation interspécifique est fréquente. Le genre *Populus* s'étend sur une grande partie de l'hémisphère nord (figure 2).

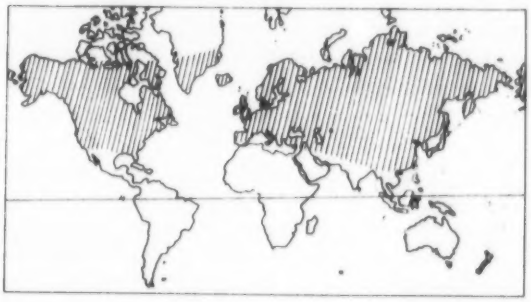


Figure 2. Répartition géographique du genre *Betula* (d'après Krüssmann 1976)

On retrouve le groupe *Leuce* (tremble) du genre *Populus* dans toute la zone tempérée de l'hémisphère nord. Les espèces principales de ce groupe sont *P. tremula* et *P. alba* en Eurasie, *P. tremuloides* et *P. grandidentata* en Amérique du Nord. On ne peut multiplier les trembles en pratiquant des boutures racinées. Le groupe *Aigeiros* comprend plus de 90% de tous les peupliers cultivés dans le monde. Les deux espèces principales de ce groupe sont *P. nigra* de la région méditéranéenne et *P. deltoides* en Amérique du Nord. Les cultivars sont des hybrides qui se multiplient facilement par bouturage. Les trois autres groupes, *Turanga, Tacamahaca* et *Leucoides* comprennent certaines espèces qui offrent un potentiel intéressant. (FAO 1979, Herpka 1985).

L'isolement géographique a longtemps freiné l'apparition des hybrides naturels. Les déplacements des populations humaines et les cultures à grande échelle ont brisé cet isolement, favorisant ainsi l'apparition de nombreux hybrides sponta-

nés. L'incompatibilité interspécifique est manifestement rare dans le genre *Populus*. Les croisements artificiels entre espèces, et même entre groupes, ont été fructueux et on a observé une grande diversité au niveau de la descendance de ces croisements (Mühle-Larsen 1970, FAO 1979). Les programmes d'amélioration génétique des peupliers, en Europe tout particulièrement, sont beaucoup mieux développés que ceux s'appliquant aux autres espèces (Teissier de Cros 1984).

Le genre *Salix* comprend plus de 300 espèces réparties en trois sous-genres: *Salix*, *Vetrix* et *Chamaetia* (Skvortsov 1968). Seuls les sous-genres *Salix* et *Vetrix* offrent un intérêt en ce qui a trait à la production de biomasse.

Le nombre chromosomique de base du genre *Salix* est x=19. On retrouve dans ce genre toute une gamme de nombres chromosomiques, allant de 2n=38 à 2n=190 (Chmelar et Meusel 1976). C'est entre espèces qu'on observe les principales différences relatives à la polyploïdie, mais beaucoup d'espèces présentent plusieurs niveaux de polyploïdie. La variabilité est élevée chez plusieurs espèces et les hybrides sont communs. Chez les saules, on retrouve aussi bien des arbres de taille moyenne que des arbustres nains (*S. herbacea*). Les saules sont dioïques et pollinisés par les insectes. Le bouturage donne de bons résultats et les saules peuvent produire des rejets facilement.

Les saules ont une vaste répartition géographique (figure 3) étant donné les multiples adaptations qui leur permettent de vivre dans différents types de sols et sous des climats variés. L'hybridation interspécifique est facile à réaliser. Le genre *Salix* offre un imposant pool génétique qui n'a pas tellement été exploité à ce jour (Malmivaara et al. 1971). Les quelques espèces et lieux de

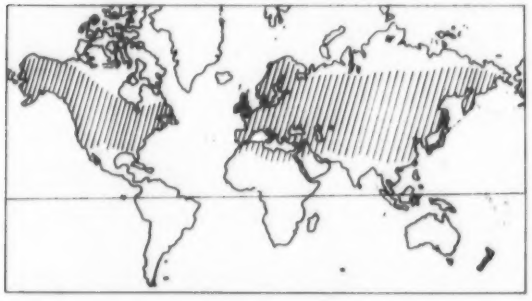


Figure 3. Répartition géographique du genre *Populus* (d'après Krüssmann 1976)

récolte exploités ne représentent qu'un petit échantillon choisi au hasard. Un programme systématique d'amélioration génétique chez le genre *Salix* pourrait donner des résultats intéressants.

Le genre *Betula* se retrouve dans toute la zone tempérée de l'hémisphère nord (figure 4). Ce genre comprend environ 50 espèces, réparties en trois groupes : *Nanae*, *Albae* et *Costatae*. Le bouleau a une certaine valeur comme arbre forestier, du moins en Scandinavie. C'est un arbre qui a une croissance juvénile rapide et qui a la capacité de produire des rejets. On peut maintenant multiplier végétativement *B. pendula* (Ryynänen et Ryynänen 1986). Le bois de bouleau a une valeur énergétique élevée par unité de volume (Ferm et al. 1985). Enfin, le genre *Betula* présente une grande variabilité génétique et on y retrouve plusieurs niveaux de polyploïdie.

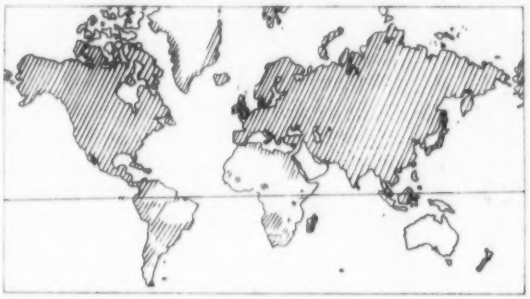


Figure 4. Répartition géographique du genre *Salix* (d'après Krüssmann 1976)

Ce qui a été dit précédemment met en relief l'immense variabilité génétique dont nous disposons pour améliorer ces espèces.

Cependant, la plus grande part de cette richesse n'a pas encore été exploitée. Pour mener à bien la production de biomasse et d'énergie par la sylviculture à courte révolution, on doit mettre en œuvre des programmes d'amélioration génétique solides et ambitieux. L'instauration des populations génétiques et la définition de l'idéotype sont les deux prérequis essentiels. Une fois les opérations de sélection et de recombinaison réalisées, ces projets devraient rapidement produire des clones et des cultivars beaucoup plus productifs que ceux utilisés jusqu'ici.

La stratégie d'amélioration génétique proposée par Gullberg et Kang (1985) cadre bien avec nos objectifs (figure 5). Dans ce modèle, une po-

pulation génétique à long terme et isolée physiquement sert de substrat aux expériences d'amélioration génétique et des projets à court terme mettent en pratique les résultats obtenus de façon intermittente. La recherche d'appoint agit comme catalyseur à tous les échelons. Comme on l'a déjà dit, l'amélioration génétique est menée à bien par l'alternance de la sélection avec la recombinaison. Pour ce qui est des applications pratiques, nous devons avoir à l'esprit que les génotypes supérieurs doivent être reproduits en quantités suffisantes et à un coût raisonnable.

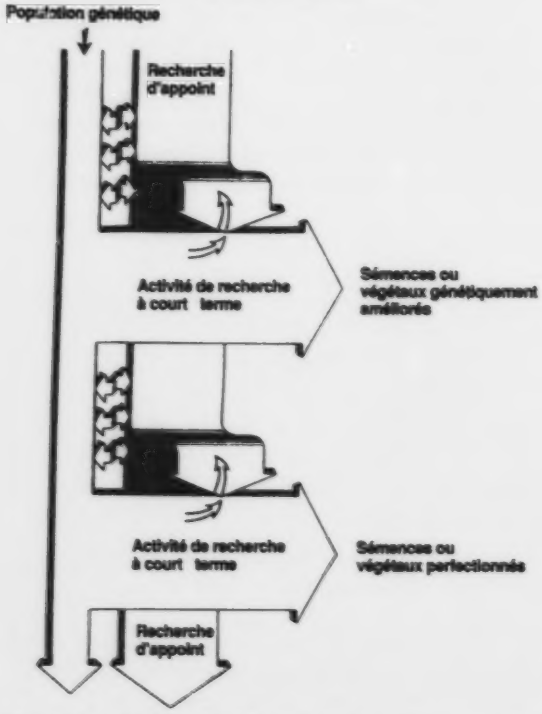


Figure 5. Modèle d'amélioration génétique des arbres (Gullberg et Kang 1985)

Dans le domaine de l'amélioration génétique, la recombinaison seule, par exemple l'hybridation artificielle de deux espèces avec fusion de protoplaste, ne suffit pas. On doit obtenir un grand nombre de recombinants permettant la sélection des meilleurs génotypes. Les recombinants recherchés ne se trouvent qu'en faible proportion.

La biotechnologie est indispensable pour obtenir les conversions énergétiques les plus efficaces particulièrement dans les domaines suivants:

1. La multiplication végétative des génotypes de valeur dont on ne peut obtenir de copies par reproduction sexuelle. Il est à noter que la multiplication végétative, par exemple la culture de tissus, n'est pas en elle-même la source de cette supériorité génétique.
2. La recombinaison permet un plus grand nombre d'alternances que la pollinisation contrôlée. Le laps de temps entre générations peut être plus court, on peut surmonter les mécanismes rendant incompatibles certaines espèces, etc.
3. La conversion microbiologique de la biomasse en sucres, en éthanol, en méthane, en acides aminées; autrement dit en matières premières, plus faciles à transporter.

La biotechnologie a progressé rapidement. Cette nouvelle technologie a été récemment appliquée avec succès à plusieurs espèces d'arbres forestiers. Pour l'instant, c'est dans la recherche d'appoint qu'elle joue son principal rôle dans le domaine de l'amélioration génétique des arbres. Puisqu'elle exige des manipulations très sophistiquées, la biotechnologie n'est pas une méthode recommandée pour le clonage des arbres non sélectionnés ni pour produire des hybrides au hasard. Cependant, dans le cadre de projets de recherches bien planifiés, la biotechnologie apporte une contribution substantielle aux projets d'amélioration génétique à long terme de populations et aux projets de courte durée, en permettant la production de végétaux améliorés.

Références

Chmelar, J.; Meusel, W. 1976. Die Weiden Europas. A. Ziemsen Verlag, Lutherstadt. 143 p.

DeBell, D.S.; Wilson, B.C. 1978. Natural variation in red alder. Pages 193-208 *in* Utilization and management of alder. USDA Forest Serv., Gen. Tech. Rep. PNW-70.

Dickman, D.I. 1975. Plant materials appropriate for intensive culture of wood fibre in the north central region. Iowa State. Res. 49:281-286.

Dickman, D.I. 1985. The ideotype concept applied to forest trees Pages 89-101 *in* Cannel, M.G.R.; Jackson, J.E., eds. Trees as crop plants. T. Wilson & Son Ltd., Kendal, Cumbria.

FAO. 1979. Poplars and willows in wood productions and land use. FAO Forestry Series No. 10. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fege, A.S. 1981. Silvicultural principles and practices in short rotation energy forestry in temperate zones. Monograph for IEA, Forestry Energy Agreement, Program B.

Germ, A.; Kauppi, A.; Rinne, P. 1985. The Potential of birch for biomass production. IEA, Forestry Energy Agreement, Program B.

Gullberg, U.; Kang, H. 1985. A model for tree breeding. Studia Forestalia Suecica 169.

Hakkila, P., ed. 1985. Metsäenergian mahdollisuudet Suomessa. Pera-projektin väliraportti. [The potential of forest energy in Finland]. Interim report of PERA project. Folia Forestalia 624.

Herpka, I. 1985. Short rotation culture of poplars: state-of-the-art review and research topics for future work. Pages 100-106 *in* Mitchell, C.P. et al., eds. Proc. Joint IEA/Forestry Energy Programme and FAO/Cooperative Network on Rural Energy Forest Energy, Rungstedgaard, Denmark, Oct. 28-30, 1985. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsatser och Resultat 49:1986. pp. 100-106.

Krüssmann, G. 1976. Handbuch der Laubgehölze. Band I-III. Verlag Paul Parey, Berlin.

Lavoie, G.; Vallee, G. 1981. Inventory of species and cultivars potentially valuable for forest biomass production. IEA, Forestry Energy Agreement. NE 1981:17.

Ljunger, Å. 1959. Al och alförädling. Skogen 5/1959.

Ljunger, Å. 1972. Artkorsning och polyploidiförädling inom släktet *Alnus*. Licentiatavhandling i skogsgenetik.

Malmivaara, E.; Mikola, J.; Palmberg, C. 1971. Pajujen mahdollisuudet metsäpuiden jalostuksessa [The possibilities of willows in forest tree breeding]. Silva Fenn. 5:11-19.

Mühle-Larsen, C. 1970. Recent advances in poplar breeding. Int. Rev. For. Res. 3:1-67.

Rehder, A. 1947. Manual of cultivated trees and shrubs. Macmillan, New York.

Ryynänen, L.; Ryynänen, M. 1986. Propagation of adult curly birch succeeds with tissue culture. Silva Fenn. 20:139-147.

Siren, G. 1985. The many aspects of intensive energy forestry. Pages 52-62 *in* Egnéus, H.; Ellegård, A., eds. Bioenergy 84. Vol. II. Biomass Resources. Elsevier Applied Science Publishers, London.

Siren, G.; Lestander, T.; Sennerby, L. 1979. Standardized procedure for testing of fast-growing species, a preliminary proposal. Swedish Univ. of Agricultural Sciences, Royal College of Forestry, Energy Forestry Project, Tech. Rep. No. 2.

Skvortsov, A.K. 1968. Willows of the U.S.S.R. Nauka, Moscow.

Teissier de Cros, E. 1984. Breeding strategies with poplars in Europe. For. Ecol. Manage. 8:23-38.

Vaarama, A. & Valanne, T. 1973. On the taxonomy, biology, and origin of *Betula tortuosa* Ledeb. Kevo Subarctic Res. Station 10:70-84.

Weir, R. 1986. History and current status of the North Carolina State University-Industry cooperative tree improvement program. Papers of IUFRO conference, Joint meeting of working parties on breeding theory, progeny testing, and seed orchards, October 12-18, 1986, Williamsburg, Virginia.

Zsuffa, L.; Barkley, B. 1985. The commercial and practical aspects of short rotation forestry in temperate regions: A state-of-the-art review. Pages 39-57 *in* Egneus, H.; Ellegård, A., eds. Bioenergy 84. Vol. I. Bioenergy: State of the Art. Elsevier Applied Science Publishers, London.

CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET ULTRASTRUCTURALE DES CALS EMBRYOGÉNIQUES ET NON EMBRYOGÉNIQUES CHEZ L'ÉPINETTE DE NORVÈGE

S.R. Wann

Chercheur-Boursier en milieu industriel
Union Camp Corporation
c/o The Institute of Papier Chemistry
P.O. Box 1039
Appleton, WI54912
USA

L'obtention d'une morphogénèse soutenue dans les cultures de tissu dépend souvent de notre capacité de reconnaître un phénotype morphogénique parmi un ensemble de cellules et de tissus non morphogéniques, de l'isoler et de le reproduire sélectivement. L'embryogenèse somatique des céréales offre un exemple remarquable de réussite : on a pu séparer de la plante et garder en vie un cal nodulaire faiblement coloré et présentant une compétence embryogénique (Nabors et al. 1983).

D'après des résultats récents dans le domaine de l'embryogenèse somatique chez les conifères, seuls les cals mucilagineux et peu colorés (blanc à translucide) ont une aptitude pour l'embryogenèse (Hakman et al. 1985, Nagmani et Bonga 1985). Même si ces caractéristiques physiques sont suffisantes pour identifier les cals embryogéniques des conifères, elles nous renseignent peu sur les phénomènes accompagnant ou rendant possible l'embryogenèse somatique.

Pour en savoir davantage sur le processus de l'embryogenèse somatique chez les conifères, nous avons entrepris des analyses biochimiques et ultrastructurales des cals embryogéniques et non embryogéniques. Nous avons profité du fait que la culture d'embryons immatures (près du stade de développement des cotylédons) de l'épinette de Norvège produit une culture mixte comprenant des cals embryogéniques et non embryogéniques pour nous assurer que des différences physiologiques réelles entre les deux types de tissu allaient être mesurées. En séparant manuellement les deux types de cals dans les intervalles entre les nombreux repiquages, nous avons obtenu des lignées homogènes de cals embryogéniques et de cals non embryogéniques. Ainsi, les comparaisons biochimiques portaient sur des tissus embryogéniques et non embryogéniques ayant le même génotype, le même âge et cultivés dans les mêmes conditions.

Les paramètres biochimiques mesurés étaient le taux de dégagement de l'éthylène, la concentration spécifique (glutathion) et totale des agents réducteurs de même que le taux de synthèse des protéines. Le taux de dégagement de l'éthylène et la concentration de glutathion ont été choisis parce qu'on a déjà observé la présence de ces composés en faible quantité au cours de l'embryogenèse somatique chez la carotte sauvage (Noland et al. 1985, Earnshaw et Johnson 1985). Cependant, tous les paramètres biochimiques que nous avons mesurés se sont avérés des indicateurs valables du caractère embryogénique ou non embryogénique des cals de conifères. Les résultats obtenus montraient des différences suffisamment grandes pour caractériser de façon non équivoque la compétence embryogénique d'un tissu. Ces mesures peuvent être faites facilement et rapidement à partir de petites quantités (inférieures à 100 mg) de tissu. Comme elle ne détruit pas les tissus, la mesure du taux de dégagement de l'éthylène permet la réutilisation des tissus dans d'autres expériences.

L'analyse biochimique des deux types de tissu montre que, comparés aux cals embryogéniques, les cals non embryogéniques de l'épinette de Norvège libèrent de 20 à 100 fois plus d'éthylène, contiennent de 5 à 7 fois plus de GSH, réduisent 20 fois plus d'ions ferriques et ils ont un taux de synthèse des protéines de 10 à 20 fois inférieur.

Pour l'instant, il est difficile de dégager la signification de ces résultats. Cela ne veut pas dire qu'il faut exclure l'utilisation de ces paramètres comme marqueurs biochimiques de l'embryogenèse. On a trouvé que l'éthylène pouvait inhiber ou stimuler la morphogénèse. Cependant, le taux de dégagement de l'éthylène des cals non embryogéniques de l'épinette est proche de celui des fruits au stade du mûrissement (ce qui n'est pas nécessairement une situation enviable).

Il a déjà été observé que la croissance indifférenciée va de pair avec la présence d'une grande quantité de GSH. Les grandes quantités de GSH observées dans les tissus non embryogéniques sont compatibles avec ces résultats. On présume que le cal embryogénique de l'épinette contient

moins de GSH parce qu'il contient, dans nos conditions expérimentales, un grand nombre de structures différenciées (c'est-à-dire des embryons somatiques : 1 000 embryons par gramme de poids frais). Des taux similaires de GSH ont été mesurés lors de l'embryogenèse somatique chez la carotte sauvage (Earnshaw et Johnson 1985). Chez la carotte, on a observé des taux élevés de GSH au cours de la croissance indifférenciée (en présence de 2,4-D), alors que les taux de GSH diminuaient lors du développement embryonnaire (en l'absence de 2,4-D).

Le fait que les cals non embryogéniques réduisent plus d'ions ferriques implique que ces cals possèdent plus d'agents réducteurs que les tissus embryogéniques. Cependant, les tests de spécificité visant à établir la nature des agents réducteurs suggèrent que les acides phénoliques seraient responsables de la réduction des ions ferriques. Ces substances ne jouent pas en soi un rôle d'agent réducteur, mais sont plutôt des produits du métabolisme intermédiaire. Ainsi, on peut dire que chez le cal non embryogénique, la seule voie morphologique possible consiste dans une structure de différenciation cytologique ou chimique.

Les paramètres retenus ont été choisis en partie parce qu'ils étaient faciles à mesurer. Ainsi, les analyses biochimiques pouvaient être faites sans problème en même temps que les évaluations courantes des cultures, ce qui ajoutait une dimension biochimique à l'évaluation de la compétence morphogénique des tissus. Cependant, on doit bien prendre conscience que les marqueurs biochimiques du potentiel embryogénique ont une valeur limitée pour le repérage des tissus embryogéniques de conifères. Ces paramètres biochimiques pourraient avoir d'autres applications peut-être plus utiles. Mais avant d'être en mesure de trouver de telles applications, nous devons savoir si les caractéristiques biochimiques observées sont reliées à des processus embryogéniques déterministes ou développementaux. Pour répondre à cette question, nous avons procédé à l'inhibition enzymatique de la synthèse de certaines substances pendant la différenciation embryonnaire (en présence de 2,4-D) et pendant le développement embryonnaire (en l'absence de 2,4-D). Les systèmes enzymatiques que nous avons inhibés sont le système PAL (à l'aide de l'acide aminooxyphényl propionique (AOPP), un inhibiteur spécifique) et le système glutamylcysteine synthétase (à l'aide d'un autre inhibiteur spécifique, la buthione sulfoximine (BSO)). L'inhibition de ces enzymes devrait avoir pour effet une diminution des quantités d'acides phénoliques (avec l'AOPP) et de GSH (avec le BSO). Suivant les résultats biochimiques obtenus avec les cals embryogéniques, la réduction de l'activité de ces deux systèmes enzymatiques devrait favoriser l'embryogenèse de quelque manière.

Nos résultats ont montré que l'addition de ces inhibiteurs enzymatiques favorise le développement embryonnaire ou la maturation des embryons plutôt qu'une intensification de la formation des embryons. On peut donc penser qu'une perturbation des systèmes biochimiques étudiés favorisera la transition critique du stade de prolifération embryonnaire à celui du développement embryonnaire. Cette question présente actuellement un grand intérêt puisque seulement un faible pourcentage (environ 1 %) des embryons différenciés deviennent des plantes. Cette méthode ne pourra être exploitée avec succès dans le domaine de la multiplication végétale que si on améliore le taux de conversion des embryons en végétaux.

On pouvait facilement distinguer les deux types de cal par leur couleur. Le cal embryogénique de l'épinette est incolore, même s'il s'est développé à la lumière, alors que le cal non embryogénique est vert. De façon prévisible, le cal non embryogénique contenait plusieurs fois la quantité de chlorophylle observée dans le cal embryogénique et les chloroplastes présents dans le cal non embryogénique avaient une structure similaire à celle des chloroplastes des jeunes plants. Par contraste, le cal embryogénique contenait des chloroplastes particuliers dépourvus de l'organisation membranaire thylakoïde des grana. Un type similaire de chloroplaste a été observé chez le cal embryogénique du mélèze d'Europe. Cette observation nous laisse croire que ces plastides particuliers peuvent être des indicateurs ultrastructuraux de la compétence embryogénique chez les conifères. Une analyse des chloroplastes de jeunes plants d'épinette et de mélèze qui ont germé à la noirceur a montré que ces chloroplastes inhabituels ne sont pas un type intermédiaire apparaissant au cours du développement normal des chloroplastes quand ceux-ci passent d'un milieu non éclairé à un milieu éclairé. D'après certaines observations préliminaires, il s'agirait plutôt de chloroplastes spécifiques de l'embryon pouvant servir à identifier de façon non équivoque les embryons somatiques des conifères.

En conclusion, il apparaît que sur le plan biochimique, l'embryogenèse somatique des Gymnospermes a plusieurs points communs avec celle des Angiospermes. Cette similarité, sans être inattendue, est quelque peu surprenante étant donné que les méthodes de culture de tissus chez les Gymnospermes sont très différentes de celles utilisées chez les Angiospermes. Il reste que l'on pourrait probablement augmenter notre maîtrise de l'embryogenèse somatique des Gymnospermes en tenant compte des facteurs qui agissent sur l'embryogenèse somatique des Angiospermes.

Références

Earnshaw, B.A.; Johnson, M.A. 1985. The effect of glutathione on development in wild carrot suspension cultures. Biochem. Biophys. Res. Comm. 133: 988-993.

Hakman, I.; Fowke, L.L.; von Arnold, S.; Eriksson, T. 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Sci. 38:53-59.

Nabors, M.W.; Heyser, J.W.; Dykes, T.A.; DeMott, K.J. 1983. Long-duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. Planta 157:385-391.

Nagmani, R.; Bonga, J.M. 1985. Embryogenesis from immature subcultured callus of *Larix decidua*. Can. J. For. Res. 15:1088-1091.

Noland, T.L.; Verhagen, S.A.; Einspahr, D.W. 1985. Genotypic and species differences in ethylene production during suspension culture of wild carrot (*Daucus carota* L.) and loblolly pine (*Pinus taeda* L.), Page 250 *in* Randall, D.D. et al., eds. Proc. 4the Ann. Plant Biochem. Biophys. Symp., Univ. Missouri, Columbia, Mo.

LA BIOCHIMIE DU DÉVELOPPEMENT VÉGÉTAL ET SES APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES CHEZ LES CONIFÈRES

E.G. Kirby

Department of Botany
Rutgers University
Newark, NJ 07102
USA

La régénération végétale à partir de différents types d'explants a déjà été pratiquée chez plusieurs espèces de conifères (Thorpe et Biondi 1984). Aussi, on peut maintenant créer des vergers à graines en utilisant la multiplication végétale *in vitro* des génotypes supérieurs (Farnum et al. 1983). Cependant, la biotechnologie végétale ne nous permet pas encore de produire efficacement des plants entiers à partir de cultures de cals ou de cellules.

L'interaction entre les auxines et les cytokinines au cours de la production des pousses adventives dans les cultures de cotylédons du Douglas taxifolié, *Pseudotsuga menziesii* Mirb. (Franco), est bien connue. Les cultures de cotylédons du Douglas taxifolié produisent un grand nombre de pousses adventives. Ainsi, il a été possible de mener des études préliminaires portant sur la biochimie de la morphogenèse (Hasegawa et al. 1979, Yasuda et al. 1980). Seule une compréhension des processus fondamentaux de la morphogénèse des structures capables de régénération (par exemple les cotylédons) nous permettra de contrôler les processus impliqués dans les cultures de cals et de cellules des conifères importants.

L'analyse histochimique de la production de pousses par les cals du tabac en milieu de culture *in vitro* a démontré que les quantités d'ARN et de protéines augmentent alors que la quantité d'ADN reste constante. On peut donc penser que la formation de pousses s'accompagne d'une intensification de la transcription et de la traduction (Thorpe et Murashige 1970). De plus, l'augmentation de la quantité d'enzymes glycolytiques, indiquant des taux de respiration accrus, vient corroborer l'idée selon laquelle il y aurait une altération du métabolisme au cours de la production *in vitro* de pousses par les cals du tabac (Thorpe et Laishley 1973). Enfin, les données de Hasegawa et al. (1979) laissent croire que le métabolisme des protéines ait altéré au cours de l'organogénèse dans les cultures de cotylédons du Douglas taxifolié.

Il a été démontré que la présence de cytokinines dans une culture de cotylédons de *Pinus radiata* modifiait la synthèse de l'ARN et des protéines en moins de 24 heures (Villalobos et al. 1984). Dans cette expérience, la nature des ARN n'a pas été déterminée. Les cytokinines modifient l'expression génique chez un grand nombre de végétaux. Elles ont notamment pour effet d'augmenter la synthèse protéique totale et l'activité de l'hydroxypyruvate réductase, sensible au cycloheximide chez les cotylédons de la critrouille (Chen et Leisner 1985). Aussi, des bourgeons mâles féminisés de *Mecurialis annua* produisent, sous l'action de la cytokinine, des ARN typiques de certains organes (Delaique et al. 1984).

Theologis et Ray (1982) ont étudié l'effet des auxines sur les processus moléculaires dans la tige du pois. Ils ont isolé de l'ARN poly(A)$^+$ et ont utilisé un dispositif de traduction *in vitro* dans une expérience où un traitement de courte durée avec de l'auxine a entraîné la traduction de cinq peptides spécifiques. Des travaux plus récents (Walker et al. 1985) ont montré que l'addition de cytokinine à des tiges de pois, en phase d'élongation, ne modifie pas les phénomènes produits par l'auxine ce qui donne à penser que l'auxine et la cytokinine agissent de façon indépendante dans l'activation de la transcription. Par ailleurs, l'induction intensive de bourgeon (à l'aide d'une forte quantité de cytokinine et d'une faible quantité d'auxine) chez les cotylédons du Douglas taxifolié entraîne une augmentation de la synthèse des protéines de faible poids moléculaire (16 000 à 20 000 daltons) deux jours seulement après le début de l'expérience (Hasegawa et al. 1979).

Bien que l'embryogenèse et la caulogenèse ne soient pas parfaitement analogues, Sung et Okimoto (1981) ont démontré que chez la carotte, la réponse embryogénique dépend d'une régulation phytohormonale de la traduction. La production de protéines spécifiques, nommées E1 et E2, augmente quand on transfère des cellules de carotte dans un milieu dépourvu d'auxine. La production de ces protéines a été utilisée comme indicateur précoce de la réponse embryogénique. Les mêmes auteurs (1983) ont montré que la production des protéines spécifiques du cal et de l'embryon est contrôlée par l'auxine : la présence d'auxine en-

traîne la production de protéines spécifiques du cal tandis que le retrait de l'auxine entraîne la production de protéines spécifiques de l'embryon.

Ce qui se dégage des travaux récents, c'est que la transcription et la traduction (c'est-à-dire l'expression génique) sont rigoureusement contrôlées durant le développement végétal. Au cours de l'embryogenèse du coton, les sous-familles des protéines de réserve de la graine sont produites à des taux relatifs identiques au cours du développement (Dure et al. 1984). Même si chaque sous-famille montre des taux de production variables, les accroissements des taux de production restent proportionnels. Cela suggère qu'un signal spécifique contrôle l'expression de toutes les sous-familles de protéines de réserve pendant le développement.

Le fait que des acides aminés marqués soient incorporés dans des protéines deux jours après qu'on eut mis en culture des cotylédons du Douglas taxifolié dans un milieu provoquant la formation de bourgeons (Hasegawa et al. 1979) laisse croire que des produits de la transcription apparaissent dans moins de 48 h. Dans des cultures de tissus de la tige du pois, Theologis et Ray (1982) ont observé, en réponse à la présence d'auxine, l'apparition d'ARN poly(A)$^+$ spécifique 2 h seulement après avoir mis les tissus en culture. D'après ces résultats, l'étude des processus moléculaires relatifs à la caulogenèse chez les cotylédons du Douglas taxifolié devrait commencer 2 heures seulement après la mise en culture des cotylédons dans un milieu entraînant la formation de bourgeons.

Nous avons isolé l'ARN total de cotylédons du Douglas taxifolié incubés pendant 4 h dans un milieu liquide contenant du N6-benzylaminopurine (BAP) 5 M et de l'acide naphtalène acétique (ANA) 5 nM, en utilisant la méthode du chlorure de guanidinium/césium. Trois témoins ont été utilisés : milieu de culture contenant du BAP 5 M seulement, milieu de culture contenant de l'ANA 5 nM seulement et milieu de culture sans aucun régulateur de croissance. Nos expériences de traduction *in vitro* (utilisant un système à base d'embryons de blé) de populations d'ARN poly(A)$^+$ sélectionné ont montré que dans tous les traitements, la production de protéines était supérieure à la production endogène. Nous avons utilisé l'électrophorèse unidimensionnelle et bidimensionnelle sur gel et l'autoradiographie pour analyser les produits de la traduction. La production d'une protéine de faible poids moléculaire (environ 14 000 d) a été induite dans les cotylédons mis en présence d'ANA 5 nM et aussi dans les cotylédons mis en présence à la fois d'ANA 5 nM et de BAP 5 M. Ces résultats corroborent ceux de Hasegawa et al. (1979) obtenus au cours de leur expérience, montrant que la différentiation des cotylédons du Douglas taxifolié s'accompagnait de l'incorporation des acides aminés radioactifs dans les protéines. Cependant, nos résultats montrent qu'il n'y a pas eu production de protéines à faible poids moléculaire lors de l'essai avec auxine seulement. Nous étudions actuellement le profil temporel de production des ARN en utilisant des régulateurs de croissance spécifiques et en analysant des produits de la traduction sur gels bidimensionnels. Selon nos résultats, les polypeptides présentent des différences qui sont fonction de la durée de la culture et des régulateurs de croissance spécifiques utilisés. Nous allons aussi entreprendre la création d'une banque d'ADN complémentaire à partir des ARN obtenus au cours des expériences de production de bourgeons chez le Douglas taxifolié. Nous procéderons ensuite au criblage rigoureux de cette banque. Nous pourrons ainsi obtenir des clones dérivés des phénomènes précoces de transcription ayant lieu au cours de la formation des bourgeons.

Références

Chen, C.-M.; Leisner, S.M. 1985. Cytokinin-mediated gene expression in excised pumpkin cotyledons. Plant Physiol. 77:99-103.

Cheng, T.-Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). Plant Sci. Lett. 2:97-102.

Delaique, M.; Poulain, T.; Durand, B. 1984. Phytohormone control of translatable RNA populations in sexual organogenesis of the dioecious plant *Mercurialis annua* L. (2n=16). Plant Molec. Biol. 3:419-429.

Dure III, L.; Pyle, J.B.; Chalan, C.A.; Baker, J.C.; Galau, G.A. 1984. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. XVII. Developmental expression of genes for the principle storage proteins. Plant Molec. Biol. 2:199-206.

Farnum, P.; Timmis, R.; Kulp, J.L. 1983. Biotechnology of forest yield. Science 219:694-702.

Hasegawa, R.M.; Yasuda, T.; Cheng, T.-Y. 1979. Effect of auxin and cytokinin on newly synthesized proteins of culture Douglas fir cotyledons. Physiol. Plant 46:211-217.

Sung, Z.R.; Okimoto, R. 1981. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78:3683-3687.

Sung, Z.R.; Okimoto, R. 1983. Coordinate gene regulation during somatic embryogenesis in carrots. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80:2661-2665.

Theologis, A.; Ray, P.M. 1982. Early auxin-regulated polyadenylated mRNA sequences in pea stem tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:418-421.

Thorpe, T.A.; Biondi, S. 1984. Conifers. Pages 435-470 *in* Sharp, W.R. et al., eds. Handbook of Plant Cell Culture Vol. 2. MacMillan, New York.

Thorpe, T.A.; Murishige, T. 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus. Can. J. Bot. 48:277-285.

Thorpe, T.A.; Laishley, E.J. 1973. Glucose exidation during shoot initiation in tobacco callus cultures. J. Exp. Bot. 24:1082-1089.

Villalobos, V.M.; Oliver, M.J.; Yeung, E.C.; Thorpe, T.A. 1984. Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of radiata pine cultures *in vitro*. Physiol. Plant 61:483-489.

Walker, J.C.; Legocka, J.; Edelman, L.; Key, J.L. 1985. An analysis of growth regulator interactions and gene expression during auxin-induced cell elongation. Plant Physiol. 77:847-850.

Yasuda, T.; Hasegawa, P.M.; Cheng, T.-Y. 1980. Analysis of newly synthesized proteins during differentiation of cultured Douglas fir cotyledons. Physiol Plant. 48:83-87.

TRANSFERT DE L'ADN CHEZ LES PINS

R. Sederoff[1], A.-M. Stomp, W.S. Chilton[3], et L.W. Moore4

[1]USDA Forest Service, P.O. Box 245, Berkeley, CA 94701, USA
Dept. Forestry, North Carolina State Univ., Raleigh, NC 27695, USA
[3]Dept. Botany, NC State Univ., Raleigh, NC 27695, USA
[4]Dept. Botany and Plant Pathology, Oregon State Univ., Corvallis, OR 97331, USA

Introduction

La longueur de la durée de génération des arbres forestiers rend difficile l'analyse génétique de plusieurs espèces commerciales importantes. On pourrait lever cet obstacle en faisant appel aux ressources de la génétique moléculaire pour créer une méthode qui permet de transférer directement des gènes spécifiques dans les espèces voulues. Une telle méthode rendrait possible d'améliorer génétiquement les arbres forestiers indépendamment de leur cycle sexué. Nous avons choisi de créer un système de transfert de l'ADN chez les pins parce que ceux-ci se prêtent favorablement aux expériences de génie génétique et qu'ils constituent une ressource naturelle importante partout dans le monde.

Il existe déjà plusieurs systèmes de transfert de l'ADN chez les animaux et les plantes supérieures. La micro-injection de l'ADN est la méthode la plus directe et elle a d'abord été pratiquée chez les embryons animaux. Cette méthode a donné de bons résultats pour les cellules animales et pour le tabac. Une autre méthode est la pénétration directe de l'ADN dans les cellules, ce qui donne de bons résultats chez les plantes supérieures. Cependant, le meilleur système de transférer l'ADN chez les plantes supérieures est celui qui utilise *Agrobacterium tumefaciens*, un micro-organisme du sol (Gordon 1988). Cette bactérie peut attaquer certains conifères et transférer l'ADN dans les cellules de plantes hôtes sensibles. On a déjà tenté d'inoculer *Agrobacterium tumefaciens* chez plusieurs espèces de pins mais ces essais ont été infructueux (DeCleen et DeLay 1976). Nous pensons que la spécificité de la virulence d'*Agrobacterium tumefaciens* n'aurait pas été examinée adéquatement et que nous pourrions très certainement trouver une manière de transférer certains gènes de notre choix dans les cellules de ces arbres, si les pins se révélaient sensibles à cette bactérie.

Méthodologie et résultats

Dans le but d'obtenir une combinaison hôte sensible - pathogène, nous avons testé un large éventail de souches bactériennes provenant de sources diverses sur des jeunes plants de pin taeda, *Pinus taeda* L. Dans notre première série de 19 souches, nous avons trouvé deux souches capables de provoquer la formation de tumeurs chez de jeunes plants ou chez des germinants en milieu de culture (Sederoff et al. 1986). Cependant, comme la fréquence de formation des galles était basse, nous avons dû vérifier si ces galles provenaient bien du transfert et de l'expression des gènes bactériens dans les cellules du pin taeda. Pour ce faire, nous avons mis en culture les tissus tumoraux et avons tenté de détecter des opines, substances présentes dans les cellules transformées par *A. tumefaciens* (Sederoff et al. 1986).

Les opines sont des métabolites inhabituels produits dans les cellules tumorales transformées par *A. tumefaciens*. Elles peuvent donc servir de marqueur chimique du transfert de l'ADN. Les opines sont formées par condensation entre des acides aminés, des monosaccharides et des substances intermédiaires du cycle de Krebs ou de la glycolyse. Plus d'une douzaine d'opines différentes ont été déjà isolées et caractérisées. Comme les différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, une fois les cellules végétales infectées, entraînent la production d'opines différentes, la présence de telle ou telle opine permet d'identifier la souche bactérienne intervenue dans la transformation des cellules végétales.

Nous avons utilisé des cals transformés de tournesols pour identifier les opines spécifiques qu'on devait obtenir si nos galles s'étaient formées par transfert de l'ADN. Par ailleurs, nous avons préparé des extraits de tissus de pins (tissus dérivant de galles) et nous avons analysé ces extraits en utilisant l'électrophorèse sous haute tension et en procédant au criblage spécifique des opines.

Nous avons trouvé de l'agropine dans des extraits d'un cal du pin issu d'une galle produite par l'inoculation de la souche U3 de *A. tumefaciens* dans un jeune plant. Nous avons aussi trouvé de la nopaline en grande quantité dans des tissus is-

sus de galles induites chez le pin taeda par la souche M2/73. Ces résultats, conformes à ceux obtenus avec le tournesol, donnent à penser que c'est bien le transfert de l'ADN d'*A. tumefaciens* dans les cellules du pin qui est responsable de la formation des galles (Sederoff et al. 1986).

Suite aux résultats obtenus avec le pin taeda, nous avons voulu explorer le spectre d'activité des souches U3 et M2/73 chez le genre *Pinus*. Ainsi, nous avons mené une étude plus étendue pour savoir si nous pouvions obtenir des galles chez d'autres espèces de pins. Plusieurs autres espèces de pins - le pin à sucre, *Pinus lambertiana* Dougl.; le pin de Virginie, *P. virginiana* Mill.; le pin sylvestre, *P. sylvestris* L.; le pin de Monterey, *P. radiata* D. Don.; le pin d'Elliot, *P. elliottii* Engelm.; le pin ponderosa, *P. ponderosa* Laws. – se sont avérées sensibles à *A. tumefaciens*. Cependant, on a observé une variabilité importante quant au degré de sensibilité des espèces et quant à l'action des différentes souches bactériennes sur une espèce donnée. Nous avons fait les analyses nécessaires pour vérifier s'il y a eu effectivement transfert et expression des gènes responsables de la synthèse des opines. Nous pouvons conclure que les pins sont généralement sensibles à *A. tumefaciens*, mais la virulence des souches varie selon l'espèce hôte.

La mise au point d'une technique générale de transfert de l'ADN repose pour une bonne part sur la possibilité de transférer et d'exprimer des marqueurs qui nous permettent de sélectionner les cellules ou les tissus transformés. La résistance aux antibiotiques de la classe des glycosamines est l'un de ces marqueurs. Ces antibiotiques sont des inhibiteurs efficaces de la synthèse des protéines dans les cellules des procaryotes et des eucaryotes. On a observé que la phosphorylation enzymatique de ces composés est responsable de la résistance bactérienne à ces antibiotiques. Une de ces enzymes, la néocymine phosphotransférase II (NPT II), a déjà été transférée et exprimée dans plusieurs plantes supérieures et rend ces plantes résistantes à la kanamycine et à d'autres antibiotiques apparentés (Bevan et al. 1983). Plusieurs vecteurs utilisés dans *A. tumefaciens* et contenant un gène chimère codant la NPT-II, contrôlé par le promoteur de la nopaline synthase (nos), ont déjà été construits. Nous avons utilisé le plasmide pEND4K, un plasmide qui présente une origine de réplication ColE1, un site de clonage multiple avec complémentation alpha, un site lambda cos, et un large éventail d'hôtes en plus du gène chimère nos-NPT-II (Klee et al, 1985).

Nous avons introduit le vecteur pEND4K dans une souche virulente et nous l'avons inoculé *in vitro* dans des pousses de pin à sucre. Les galles ainsi obtenues ont été mises en culture, de la même manière que s'il s'agissait des cals, et nous avons effectué trois transferts dans des milieux contenant de la kanamycine. Grâce à la méthode d'analyse de Reiss et al. (1984), l'activité enzymatique typique de la NPT II a été observée dans les tissus obtenus.

Conclusions

A. tumefaciens est un organisme qui offre de nombreux avantages pour le transfert et l'expression des gènes étrangers dans les cellules de pins. Les techniques présentées ici pourront probablement s'appliquer à plusieurs espèces commerciales de pins et laissent entrevoir d'intéressants développements dans le domaine du génie génétique appliqué à ces arbres forestiers. Néanmoins, l'obstacle principal qui entrave ces développements, c'est la difficulté de régénérer un pin à partir de cellules ou de tissus transformés.

Références

Bevan, M.; Flavell, R.B.; Chilton, M.-D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304:184-187.

De Cleen, M.; DeLey, J. 1976. The host range of crown gall. Bot. Rev. 42:389-466.

Gordon, M. 1988. These proceedings.

Klee, H.J.; Yanofsky, M.F.; Nester, E.W. 1985. Vectors for transformation of higher plants. Bio/technology 3: 637-642.

Reiss B.; Sprengel, R.; Will, H.; Schaller, H. 1984. A new sensitive method for qualitative and quantitative assay of neomycin phosphotransferase in crude cell extracts. Gene 30:211-218.

Sederoff, R.R.; Stomp, A.-M.; Chilton, W.S.; Moore, L.W. 1986. Gene transfer into loblolly pine by *Agrobacterium tumefaciens*. Bio/technology 4:647-649.

LA TRANSFORMATION DES CELLULES VÉGÉTALES

M.P. Gordon

Department of Biochemistry
University of Washington
Seattle, WA 98195
USA

En transformant les cellules de sa plante hôte, *Agrobacterium tumefaciens* crée sa propre niche écologique. Cette bactérie peut transformer les cellules grâce à ses plasmides cataboliques de grande taille (pTi), lesquels sont responsables de la formation de tumeurs chez les végétaux. La région du plasmide qui est transférée et incorporée dans l'ADN nucléaire des cellules végétales, l'ADN-T, est délimitée par deux séquences identiques de 24 paires de bases. L'ADN-T contient les gènes responsables de la synthèse de l'acide indol-acétique, de l'isopentenyl-AMP et d'un certain nombre d'opines.

Les gènes de l'ADN-T sont eucaryotes et l'expression de ces gènes entraîne une croissance désordonnée des cellules végétales et l'utilisation, par la bactérie, des métabolites hôtes pour synthétiser des opines. Le pTi a une action catabolique et permet à la bactérie responsable de la transformation de la cellule végétale d'utiliser les opines. Une autre région du pTi, la région vir, est de nature procaryote et contient six loci de transcription : vir A, B, G, C, D et E. Une mutation par insertion dans l'un de ces loci enlève toute virulence au plasmide. La détermination de la séquence des loci vir est pratiquement terminée aujourd'hui.

Nous avons maintenant quelques indices à propos du rôle que jouent certains de ces gènes. L'expression du loci vir A est constitutive et la présence du produit de ce gène a été détectée dans des fractions membranaires de *A. tumefaciens* (Winans et al. 1986). Nous pensons que le produit du gène A, une protéine transductrice, réagit avec les substances produites par des cellules végétales endommagées, comme l'acétosyringine ou des polyphénols, ce qui entraîne une intensification de la transcription et l'activation du locus vir G. Ce phénomène est similaire à celui qui a été observé chez un certain nombre de protéines transductrices qui interagissent avec des activateurs de la transcription (Winans et al. 1986). Le produit du locus vir G initierait ensuite l'expression de loci vir B, C, D et E. Les produits codés par les deux premiers cadres de lecture déroulés du locus vir D produisent des coupures monocaténaires à des endroits identiques dans les deux séquences de l'ADN répétitif de 24 paires de bases qui encadrent l'ADN-T (Yanofsky et al. 1986). Par ailleurs, les résultats d'autres chercheurs indiquent qu'il s'agirait plutôt de coupures bicaténaires (Kovkolikova-Nicola et al. 1985). Nous ne comprenons pas encore complètement comment l'ADN-T est tranformé et incorporé dans le génome de la plante hôte. Le locus vir C a un effet sur le spectre d'activité de la bactérie. La souche A 348, une souche ayant un large spectre d'activité, provoque une vive réaction de défense chez le raisin alors que des mutants vir C de la même souche réussissent à transformer les cellules du raisin (Yanofsky et al. 1985). Un caractère supplémentaire encodé par la région vir, le caractère "supervir", augmente la transformation du peuplier (Pythoud et al. 1987) et étend le spectre d'activité d'*A. tumefaciens* à certaines légumineuses ayant une grande valeur agricole comme la luzerne et la fève soya (Kumari 1985).

Le mode d'action des autres gènes vir et la manière dont ils jouent leur rôle nous sont inconnus. Nous savons cependant que certains gènes chromosomiques sont responsables de la virulence d'*A. tumefaciens* et que, bien sûr, le plasmide Ti ne peut être actif qu'en présence de l'appareil chromosomique d'*Agrobacterium* ou de celui de *Rhizobium*, un genre très semblable à *Agrobacterium*. La fixation des cellules bactériennes aux cellules végétales est rendue possible grâce à l'action des gènes chromosomiques A et B (Douglas et al. 1982). Ces deux gènes dont dépend la virulence d'*Agrobacterium* ainsi que les gènes nod A et B de *Rhizobium* sont interchangeables (Dylan et al. 1986). Enfin, la mutation Ros permet l'expression des loci vir C et D (Close et al. 1985).

Il appert que la transformation des fragments de feuille par *Agrobacterium tumefaciens* est la meilleure méthode en matière d'amélioration génétique des végétaux, à condition bien sûr que l'on ait accès à des gènes clonés et qu'il soit possible de régénérer des plants adultes en se servant des fragments de feuille (Horsch et al. 1985). *Agrogacterium tumefaciens* peut aussi être utilisé pour transformer des protoplastes ou des cultures de cellules végétales en milieu liquide et à croissance rapide. Une autre possibilité consiste à fusionner des protoplastes avec des sphéroplastes d'*Agrobacterium*.

La transformation des cellules végétales peut aussi se faire à l'aide d'ADN libre. Cette technique offre l'avantage de nous épargner l'étape du clonage des gènes. Pour augmenter la perméabilité des protoplastes à l'ADN, différentes méthodes ont été employées : pH élevé, choc thermique, utilisation de polyéthylèneglycol ou électroporation. Si l'on considère le taux de réussite de la tranformation, l'efficacité relative de chacune de ces méthodes semble varier d'un laboratoire à l'autre (Potkykus et al. 1985). Dans notre laboratoire, où nous avons utilisé des protoplastes du tabac, c'est l'électroporation avec commutation électronique qui a donné les meilleurs résultats. Nous avons utilisé une pile de 250 volts/4 mm et un condensateur de 200 à 400 microfarads. L'article de Bradshaw et al. (1987) décrit l'appareil en détail. Depuis qu'on a réussi à augmenter la perméabilité des protoplastes du maïs grâce à cette technique, la transformation des monocotylédones, plantes d'importance vitale, s'avère imminente.

L'ADN libre peut aussi être incorporé dans les cellules par micro-injection directe. Même si dans toutes les méthodes décrites plus haut l'ADN semble «se bousculer», l'obtention des tissus dans lesquels le gène étranger est exprimé ne semble pas poser de problème.

Références

Bradshaw, H.D. Jr.; Parson, W.W.; Sheffer, M.; Lioubin, P.J.; Mulvihill, E.R.; Gordon, M.P. 1987. Design, construction, and use of an electroporator for plant protoplasts and animal cells. Anal. Biochem. 166:342-348.

Close, T.J.; Tait, R.C.; Kado, C.I. 1985. Regulation of TI plasmid virulence genes by a chromosomal locus of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 164:774-781.

Douglas, C.J.; Halperin, W.; Nester, E.W. 1982. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. J. Bacteriol. 152: 1265-1275.

Dylan, T.; Ielpi, L.; Stanfield, S.; Kashyap, L.; Douglas, C.; Yanofsky, M.; Nester, E.; Helinski, D.R.; Ditta, G. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:4403-4407.

Fromm, M.; Taylor, L.P.; Walbot, V. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:5824-5828.

Hasezawa, S.; Nagata, T.; Syono, K. 1981. Transformation of *Vinca* protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. Mol. Gen. Genet. 182:206-210.

Horsch, R.B.; Fry, J.E.; Hoffman, N.L.; Eichholtz, D.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science. 227:1229-1231.

Kovkolikova-Nicola, Z.; Shillito, R.D.; Hohn, B.; Wang, K.; Van Montagu, M.; Zambryski, P. 1985. Involvement of circular intermediates in the transfer of T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. Nature 313:191-196.

Kumari, T. 1985. Unpubl. Masters Thesis.

Potrykus, I.; Shillito, R.D.; Saul, M.W.; Paszkowski, J. 1985. Direct gene transfer: State of the art and future potential. Plant Mol. Biol. Reporter. 3:117-128.

Pithoud, F.; Sinkar, V.P.; Nester, E.W.; Gordon, M.P. 1987. Increased virulence of *Agrobacterium* rhizogenes conferred by the vir region of pTIBO-542: Application to genetic engineering of poplar. Bio/Technology 5:1323-1327.

Van Lijsebettens, M.; Inze, D.; Schell, J.; Van Montagu, M. 1986. Transformed-cell clones as a tool to study T-DNA integration mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Mol. Biol. 188:129-145.

Winans, S.C.; Ebert, P.R.; Stachel, S.E.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. 1986. A gene essential for *Agrobacterium* virulence is homologous to a family of positive regulatory loci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:8278-8282.

Yanofsky, M.; Lowe, B.; Montoya, A.; Rubin, R.; Krul, W.; Gordon, M.; Nester, E. 1985. Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 201:237-246.

Yanofsky, M.F.; Porter, S.G.; Young, C.; Albright, L.M.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. 1986. The vir D operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. Cell 47:471-477.

L'EXPRESSION GÉNIQUE CHEZ LES VÉGÉTAUX

T.J. Parsons

Department of Biochemistry
University of Washington
Seattle, WA 98195
USA

Dans le règne végétal, il y a une grande uniformité en ce qui a trait aux signaux responsables de l'expression génique. Ces signaux restent effectifs quand on les lie artificiellement au séquence de codage des gènes hétérologues. L'application des techniques développées par le génie génétique sera facilitée par la mise au point de méthodes permettant de contrôler de façon spécifique l'expression des gènes étrangers en la restreignant à des stades de développement ou à des tissus particuliers, ou encore grâce à l'utilisation de signaux externes. Dans cette optique, nous essayons actuellement de cloner un gène des peupliers (*Populus* spp.) qui est exprimé spécifiquement quand la plante subit une blessure et d'utiliser la capacité d'*Agrobacterium* tumefaciens de transformer les cellules végétales pour savoir si la région régulatrice de ce gène peut permettre l'expression des gènes étrangers sous l'effet d'une blessure.

Plusieurs réactions biochimiques complexes gouvernent l'expression des gènes eucaryotes et la régulation de cette expression peut se faire à plusieurs échelons du mécanisme de l'expression génique. Nous ne connaissons pas assez bien les mécanismes de contrôle de la transcription, une des étapes principales de l'expression génique or, ceux-ci forment la pierre angulaire des techniques d'amélioration génétique des végétaux. Le contrôle de l'expression génique peut aussi avoir lieu au niveau de la maturation moléculaire des transcripts primaires et de leur sortie hors du noyau, au niveau de la stabilité de l'ARNm, au niveau de la traduction de l'ARNm et au niveau de la modification des protéines après la traduction. Une meilleure compréhension de ces processus permettra au génie génétique de faire des progrès importants.

La région régulatrice des gènes eucaryotes se trouve en aval (extrémité 5') de la séquence de codage des protéines. Cette région détermine le site d'initiation de l'ARN polymérase, l'enzyme primaire de la transcription. On retrouve aussi, en amont (extrémité 3') des séquences de codage, des séquences qui agissent comme signaux pour la polyadénylation des transcripts. L'appareil de transcription des procaryotes est suffisamment différent de celui des eucaryotes de manière qu'il est nécessaire de lier la séquence de codage du gène bactérien à des séquences régulatrices 5' et 3' eucaryotes afin qu'un gène bactérien puisse être exprimé dans une cellule eucaryote. Les régions régulatrices des gènes de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* ou du gène 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur sont utilisées régulièrement pour permettre l'expression constitutive des gènes bactériens dans les cellules végétales.

Ces dernières années, des recherches effectuées ont permis l'identification des éléments qui renforcent la transcription chez plusieurs gènes animaux. Ces éléments sont généralement de courtes séquences de 50 à 100 paires de bases qui peuvent renforcer l'activation de la transcription indépendamment de leur position et de leur orientation par rapport aux gènes. En outre, les renforçateurs conservent souvent leur activité quand ils sont liés à des gènes étrangers. Plusieurs renforçateurs agissent spécifiquement dans tel ou tel tissu ou sous l'effet de différents stimuli environnementaux. L'identification des éléments renforçateurs dans les gènes végétaux est récente et ceux-ci pourraient devenir de puissants outils pour préciser quand, où et dans quelle proportion un gène étranger est exprimé dans une plante.

Le rôle des renforçateurs dans un gène végétal a été clairement démontré dans une récente étude portant sur le gène *Cab* du blé, responsable de la liaison des chlorophylles *a* et *b*. Ce gène est activé par la lumière. Les auteurs de cette étude ont montré que la spécificité tissulaire du gène *Cab* et sa sensibilité à la lumière pouvaient être transférées au gène bactérien de la néomycine phosphotransférase grâce à un segment de 247 paires de bases situé en aval du gène *Cab* (extrémité 5'). De plus, les renforçateurs peuvent avoir un spectre d'activité qui s'étend à plusieurs groupes taxonomiques : le renforçateur du blé est actif dans les plants de tabac, une plante dicotylédone. Il est significatif que l'activation de la transcription est deux fois plus importante quand on met en tandem deux éléments renforçateurs du gène *Cab*. Le renforçateur du gène *Cab* peut aussi agir comme inhibiteur puisqu'il est capable, à lui seul, d'empêcher la transcription d'un gène étranger dans les cellules des racines. Ainsi, il peut être utilisé de pair avec des gènes étrangers pour contrôler l'in-

tensité de l'expression de ces gènes dans des tissus particuliers et dans des conditions environnementales spécifiques. La recherche dans ce domaine débouchera sans doute sur la découverte de plusieurs autres séquences régulatrices de ce genre, ce qui ouvrira au génie génétique de nouvelles avenues.

Notre laboratoire travaille actuellement à l'isolement d'un gène dont l'activation se fait sous l'effet d'une blessure dans le but d'analyser la région régulatrice de ce gène et de tester l'aptitude de ce gène à exprimer des gènes étrangers. Parallèlement, nous voulons améliorer les applications de la technologie de l'ADN recombinant chez les arbres à feuilles caduques. Pour les biologistes moléculaires, les peupliers constituent un matériel par excellence à cause de la petite taille de leur génome, de la facilité avec laquelle on peut obtenir des cultures de leurs tissus, de leur potentiel régénératif élevé et de la possibilité de les transformer à l'aide de l'*A. tumefaciens* (Parsons et al. 1986, Fillatti et al. 1987). Nous utilisons actuellement des techniques d'hybridation différentielle de l'ADNc pour cribler une banque d'ADNc de peupliers ayant subi des blessures et obtenir des clones des ARNm présents seulement chez les plantes ayant subi une blessure.

Dans bien des cas, on a identifié et purifié les substances qui activent les gènes responsables des réactions de défense chez les végétaux (par exemple Ryan et al. 1985, Nothnagel et al. 1983). Les régions régulatrices d'un gène activé par ces substances pourraient être utilisées pour exprimer un gène étranger; on pourrait ainsi activer ce gène étranger en appliquant de très petites quantités de ces substances activatrices. Il est rarement souhaitable qu'un gène étranger s'exprime en tout temps et dans l'ensemble des tissus d'une plante génétiquement améliorée, et dans plusieurs cas, la présence constante du produit d'un gène étranger peut s'avérer nuisible à la plante. La recherche en ce domaine devrait donc s'attarder à mettre au point des méthodes permettant de contrôler l'expression des gènes introduits artificiellement dans le génome des végétaux.

Références

Fillatti, J.J.; Sellmer, J.; McCown, B.; Haissig, B.; Comai, L. 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206:192-199.

Nothnagel, E.A.; McNeil, M.; Albersheim, P.; Dell, A. 1983. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. Plant Physiol. 71:916-926.

Parsons, T.J.; Sinkar, V.P.; Stettler, R.F.; Nester, E.W.; Gordon, M.P. 1986. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. Bio/Technology 4:533-536.

Ryan, C.A.; Bishop, P.D.; Walker-Simmons, M.; Brown, W.E.; Graham, J.S. 1985. Pectic fragments regulate the expression of proteinase inhibitor genes in plants. Pages 319-334 *in* Key, A.; Kosuge, B. eds., Cellular and molecular biology of plant stress. Alan R. Liss, New York.

Simpson, J.; Schell, J.; Van Montagu, M.; Herrerra-Estrella, L. 1986. Light-inducible and tissue specific pea 1hap gene expression involves an upstream element combining enhancer- and silencer-like properties. Nature 323:551-554.

LA PRODUCTION DES VÉGÉTAUX DU GENRE *Populus* TOLÉRANTS AU GLYPHOSATE GRÂCE À L'EXPRESSION D'UN GÈNE *aroA* MUTANT DE *Salmonella typhimurium*

J.J. Fillatti[1], J. Sellmer[2], B. McCown[2], B. Haissig[3], L. Comai[1] et D. Remenschnieder[3]

[1]Calgene, Inc., 1920 Fifth St., Davis, CA 95616, USA
[2]University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA
[3]USDA Forest Service, Rhinelander, WI USA

Introduction

L'incapacité de contrôler efficacement les mauvaises herbes est l'un des principaux facteurs qui limitent l'établissement et l'aménagement des plantations à courte révolution de *Populus* (Akinymiju et al. 1982, Hansen et Netzer 1985). Actuellement, le contrôle des mauvaises herbes se fait à l'aide de moyens mécaniques et par des applications limitées des herbicides quand les arbres sont en repos végétatif. Mais ces méthodes sont dispendieuses et seulement partiellement efficaces. Une nouvelle technique de contrôle des mauvaises herbes pourrait voir le jour, grâce à un gène élaboré par la société Calgene, conférant une résistance au glyphosate. La technologie de l'ADN recombinant peut nous permettre de créer, d'un tel gène, des cultivars de *Populus* tolérants aux herbicides. Le présent article décrit comment nous nous y sommes pris pour créer un peuplier tolérant au glyphosate.

Isolement et caractérisation du gène *aroA* mutant

Le glyphosate est un herbicide qui inhibe l'enzyme 5-énolpyruvylshikimate (EPSP) synthase, une enzyme participant à la biosynthèse des acides aminés aromatiques chez les végétaux (Steinrücken et Amrhein 1980, Amrhein et al. 1980). La surproduction de cette enzyme (Amrhein et al. 1983) ou la présence d'une enzyme modifiée (Comai et al. 1983, Rogers et al. 1983) peut permettre aux plantes de tolérer le glyphosate. Notre étude avait pour but de vérifier si l'expression d'un gène bactérien mutant et qui produit une EPSP synthase modifiée pouvait conférer une résistance au glyphosate après l'avoir introduite dans un peuplier.

Chez *Salmonella typhimurium*, l'EPSP synthase est encodée par le locus *aroA*. Nous avons obtenu des mutants résistants au glyphosate en exposant nos cultures de *S. typhimurium* à l'éthylméthanesulfonate, un agent mutagène, et en procédant au criblage de nos cultures en utilisant un milieu sélectif contenant l'herbicide. Nous avons cloné un gène *aroA* mutant des cultures résistantes. Les plasmides qui contiennent cette séquence se sont révélés aptes à compléter les souches de *S. typhimurium* présentant une mutation au locus *aroA*. La détermination de la séquence de l'allèle mutant du locus *aroA* a révélé la présence d'une seule mutation par transition où une thymine remplace une cytosine, ce qui entraîne le remplacement d'une sérine par une proline dans la séquence de l'enzyme. Cette substitition d'une seule paire de bases diminue l'affinité de l'enzyme pour le glyphosate sans influer sur l'activité de l'enzyme (Stalker et al. 1985). Dans le but d'obtenir l'expression de ce gène dans les plantes, le gène de structure *aroA* mutant a été lié aux séquences régulatrices 5′ du gène de la mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Barker et al. 1983). Nous avons ensuite introduit le gène chimérique *aroA* dans les vecteurs binaires d'*Agrobacterium* que nous décrivons ci-dessous.

La transformation végétale

Agrobacterium tumefaciens permet de transférer des gènes par voie naturelle dans plusieurs plantes dicotylédones. Au cours du cycle d'infection de l'*A. tumefaciens*, l'ADN bactérien (ADN-T) est intégré dans le génome de la plante hôte, ce qui entraîne la production de tumeurs chez la plante (Chilton et al. 1980). Les gènes qui provoquent des tumeurs peuvent être retirés et remplacés par des gènes hétérologues sans que cette opération influe sur la capacité de l'*A. tumefaciens* de transférer son ADN-T dans les plantes (DeGreve et al. 1982). Les souches modifiées d'*A. tumefaciens* ainsi obtenues peuvent être incubées avec des protoplastes, des explants ou dans des cultures de cellules en milieu liquide. Cette technique permet d'obtenir des plantes transformées exemptes de symptômes cancéreux.

Puisque la tranformation induite par *A. tumefaciens* requiert l'incubation de cellules bactériennes en présence de tissu végétal (co-culture) et la régénération subséquente de cellules transfor-

mées sélectionnées, la création d'un système de régénération efficace et l'utilisation d'un marqueur sélectif sont nécessaires. Notre premier objectif consistait à créer un système de régénération des peupliers à partir du clone hybride *Populus alba* x *Populus grandidentata* (NC5339). Ce clone a été choisi parce qu'il se prête bien à la propagation clonale à partir de cultures de pousses *in vitro*. De cette façon, nous disposons d'une source d'explants stériles. Après avoir testé plusieurs milieux différents, nous avons utilisé un milieu à pH 5,6 contenant les sels minimaux de Murashige et Skoog, du sucrose (3 %), du benzyladénine (BAP) (1 mg/L), de la zéatine (1 mg/L) et du Phytoagar (0,6 %) pour régénérer des pousses à partir d'explants de feuilles de *Populus* NC5339. Les pousses se sont développées sur les bords coupés des explants de feuilles entre 20 et 30 jours après la mise en terre. En moyenne, 1-3 pousses se sont développées chez 35 % des explants de feuilles ensemencés. Il s'est avéré, au cours de la mise au point de ce système, que la composition du milieu de culture, la pré-culture et les manipulations subséquentes des explants de feuilles agissaient sur le taux de régénération. La présence de BAP dans les milieux de culture des pousses avant l'explantation a inhibé la régénération des pousses. Puisque les peupliers sont très sensibles au stress hydrique, il a fallu couper les explants de feuilles en présence d'eau pour que la régénération ait lieu. Enfin, la taille et l'âge des explants de feuilles avaient aussi un effet sur le taux de régénération. Ce sont les jeunes feuilles coupées en segments d'au moins 2 cm^2 qui ont donné les meilleurs résultats.

Quand *A. tumefaciens* est utilisé pour transférer des gènes étrangers dans des cellules végétales, il convient d'introduire dans l'ADN-T, en plus du gène choisi, un marqueur sélectif. En conférant aux tissus transformés la résistance à un antibiotique, un tel marqueur permet de sélectionner ces tissus. Le marqueur le plus couramment utilisé dans les expériences de transformation végétale est le gène bactérien codant la néomycine phosphotransférase (NPT II') (Bevan et al. 1983, Fraley et al. 1983, Herrera-Estrella et al. 1983). Ce gène confère la résistance à la kanamycine et s'est avéré un marqueur efficace chez des espèces agricoles comme le tabac (Horsch et al. 1985), la tomate (McCormick et al. 1986, Fillatti et al., sous presse) et la laitue (Michelmore, comm. pers.). Pour vérifier la validité de ce mode de sélection chez *Populus* NC5339, nous avons ensemencé des explants de feuilles dans des milieux MS1BZ contenant 0, 20, 30, 40, 60 et 100 mg/L de kanamycine. Une concentration de 60 mg/L ou plus inhibe complètement la croissance des cals et l'initiation des pousses; nous avons donc utilisé une concentration de kanamycine de 60 mg/L dans nos expériences de co-culture.

Grâce à ce système de régénération et à ce marqueur sélectif, nous avons pu entreprendre nos expériences de co-culture d'explants et d'*Agrobacterium*. La souche C58/587/85 d'*A. tumefaciens* utilisée dans nos expériences de co-culture est un vecteur oncogène binaire contenant un plasmide C58 de type sauvage qui agit comme intermédiaire initiant le transfert du mini-plasmide pPMG587/85 (Fillatti et al. 1987). Ce mini-plasmide possède des séquences d'ADN-T qui bordent les deux gènes NPT II' et le gène *aroA* (Comai et al. 1985). L'expression de gène NPT II' est initiée par des séquences régulatrices provenant du gène de l'octopine synthétase de la souche A6 d'*A. tumefaciens* (Barker et al. 1983). L'expression de l'autre gène NPT II' et du gène *aroA* est réglée par des séquences provenant du gène de la mannopine synthétase de la souche A6 d'*A. tumefaciens* (Barker et al. 1983).

Nous avons utilisé un système modifié de co-culture d'explants de feuilles pour transformer les peupliers. Les explants de feuilles provenant de plants de *Populus* NC5339 obtenus en culture *in vitro* ont été coupés dans l'eau en fragments d'environ 2 cm^2 et préincubés durant 24 h dans un milieu nutritif à base de tabac avec un faible éclairement. On a préparé ces milieux nutritifs deux jours avant leur usage en ajoutant avec une pipette 0,5 mL d'une culture de tabac en milieu liquide dans des boîtes de Pétri (100x25 mm) qui contenaient 50 mL de milieu minimal de substances organiques de Murashige. Nous y avons ajouté du 2,4-D (0,1 mg/L), de la kinétine (1,0 mg/L), de l'hydrochlorure de thiamine (0,9 mg/L), du phosphate monopotassique (200 mg/L) et de l'agar Difco Bacto (0,8 %). Après deux jours, un papier-filtre stérile (Whatman 3 mm) a été déposé sur les cellules de tabac. Les fragments de feuilles ont été incubés dans un bouillon de culture liquide de la souche pCGN58/587/85 (2x108 bactéries par mL) pendant 30 minutes, séchés, et déposés de nouveau sur les milieux nutritifs à base de tabac pendant une période de 48 à 72 h. Après cette période de co-culture, les fragments de feuilles ont été ensemencés dans un milieu régénératif contenant de la carbénicilline (500 mg/L) et de la kanamicyne (60 mg/L). En utilisant le protocole de Reiss et al. (1984), nous avons observé l'activité enzymatique

de la NPT II' dans 38 des 40 pousses qui se sont développées et ont ensuite pris racine dans le milieu contenant de la kanamicyne. Nous avons appliqué la méthode de transfert Western aux plants de *Populus* NC5339 résistants à la kanamicyne pour vérifier si la protéine bactérienne *aroA* était présente. A l'aide d'un antisérum bactérien de l'EPSP synthase, nous avons détecté un polypeptide ayant un poids moléculaire correspondant à celui de la protéine *aroA*. Nous n'avons pas trouvé ce polypeptide dans les plantes non transformées.

Pour vérifier si le gène étranger *aroA* conférait la tolérance au glyphosate, nous avons arrosé des transformants issus de transformations indépendantes et des plantes-témoins non transformées avec du glyphosate (dose équivalente à 0,16 ou 0,25 lb/acre) et avec de l'H20 (groupes-témoins). Nous avons observé que les peupliers produisant la protéine *aroA* toléraient l'herbicide alors que les plantes-témoins non transformées étaient sensibles à l'herbicide.

Conclusion

Nous avons démontré que les peupliers pouvaient tolérer le glyphosate grâce à l'expression du gène *aroA* mutant. Nous pensons pouvoir obtenir des niveaux de tolérance plus élevés en apportant de nouvelles modifications aux séquences d'ADN qui contrôlent l'expression et la compartimentation de l'enzyme. Autant que nous sachions, l'introduction et l'expression des gènes étrangers dans un arbre forestier n'ont jamais été réalisées avant nous. La technologie du transfert de gènes sera un outil puissant pour améliorer les arbres forestiers et étudier la régulation de l'expression génique. De plus, l'existence de cultivars de *Populus* tolérants au glyphosate pourrait avoir un impact économique important sur la production de pâte commerciale de *Populus* en permettant de contrôler chimiquement les mauvaises herbes. Cela réduirait substantiellement les pertes causées par la compétition entre les mauvaises herbes et les peupliers au cours de l'établissement ainsi que de la culture subséquente des plantations.

Références

Akinymiju O.A.; Isebrands, J.G.; Nelson, N.D.; Dickmann, D.I. 1982. Use of glyphosate in the establishment of *Populus* in short rotation intensive culture. Proc. North American Poplar Council Meeting, Rhinelander, WI. Kansas State University, Division of Extension, Manhattan, KS.

Amrhein, N.; Deus, B.; Gehrke, P.; Steinrücken, H.C. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chlorimate formation *in vivo* and *in vitro*. Plant Physiol. 66:830-834.

Amrhein, N.; Johaenning, D.; Schab, J.; Schulz, A. 1983. Biochemical basis for glyphosate tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. FEBS Lett. 157:191-196.

Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. Plant Mol. Bio. 2:335-350.

Bevan, M.; Flavell, R.B.; Chilton, M-D. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304:184-187.

Chilton, M-D.; Saiki, R.K.; Yadav, N.; Gordon, M.P.; Quietier, F. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4060-4064.

Comai, L.; Sen, L.; Stalker, D. 1983. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. Science 221:370-371.

Comai, L.; Facciotti, D.; Hiatt, W.R.; Thompson, G.; Rose, R.; Stalker, D. 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. Nature 317:741-744.

DeGreve, H.; Leemans, J.; Hernalsteens, J-P.; Thia-Toong, L.; DeBeuckeleer, M.; Willmitzer, L.; Otten, L.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1982. Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumour controlling functions. Nature 300:752-755.

Fillatti, J.J.; Sellmer, J.; McCown, B.; Haissig, B.; Comai, L. *Agrobacterium* mediated transfor-

mation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. (in press).

Fillatti, J.J.; Kiser, J.; Rose, B.; Comai, L. Efficient transformation of tomato and the introduction and expression of a gene for herbicide tolerance. Tomato Biotechnology Proceedings (in press).

Fraley, R.T.; Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Sanders, P.; Flick, J.; Adams, S.; Bittner, M.; Brand, L.; Fink, C.; Fry, J.; Galluppi, G.; Goldberg, S.; Hoffman, N.; Woo, S. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807.

Hamilton, R.H.; Fall, M.Z. 1971. The loss of tumor initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by inoculation at high temperature.. Experientia 27:229-230.

Hansen, E.A.; Netzer, D.A. 1985. Weed control using herbicides in short-rotation intensively cultured poplar plantations. USDA Forest Service Research Paper NC-260.

Herrera-Estrella, L.; Depicker, A.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using Ti plasmid-derived fector. Nature 303:209-213.

Horsch, R.B.; Fry, J.B.; Hoffmann, N.L.; Wallroth, M.; Eichholtz, D.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227:1229-1231.

McCormick, S.; Niedermeyer, J.; Fry, J.; Barnason, A.; Horsch, R.; Fraley, R. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 5:81-84.

Reiss, B.; Sprengle, R.; Will, H.; Schaller, H. 1984. A new sensitive method for qualitative and quantitative assay of neomycin phosphotransferase in crude cell extracts. Gene 30:211-217.

Rogers, S.G.; Brand, L.A.; Holder, S.B.; Sharp, E.S.; Bracking, M.M. 1983. Amplification of the *aroA* gene fro *E. coli* results in tolerance to the herbicide glyphosate. Appl. Environ. Microbiol. 46:37-43.

Stalker, D.M.; Hiatt, W.R.; Comai, L. 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. J. Biol. Chem. 260:4724-4728.

Steinrüken, H.C.; Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94:1207-1212.